

University of Groningen

Cholesterol, bile acid and triglyceride metabolism intertwined

Schonewille, Marleen

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Schonewille, M. (2016). *Cholesterol, bile acid and triglyceride metabolism intertwined*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

I	References
II	ABBREVIATIONS
III	Contributing Authors & Affiliations
IV	Nederlandse Samenvatting
V	Dankwoord/Acknowledgements
VI	Biografie/Biography
VII	List of Publications

Abbreviations

AAV	adeno-associated virus
ABCA1	ATP-binding cassette transporter 1
ABCB1	ATP binding cassette subfamily B member 1
ABCG5/G8	ATP binding cassette subfamily G member 5/8
ABCG8 KO	ABCG8 knockout
ACAT2/SOAT2	acetyl-CoA acetyltransferase 2
ACC2	acetyl-CoA carboxylase 2
AS	atorvastatin
ASBT/SLC10A2	apical sodium-dependent bile acid transporter
α -MCA	α -muricholic acid
AOX	alternative oxidase
ApoA4	apolipoprotein AIV
ApoB	apolipoprotein B
ApoC2	apolipoprotein C-II
ApoE	apolipoprotein E
BA	bile acids
BHB	β -hydroxybutyrate
β -MCA	β -muricholic acid
BSA	bovine serum albumin
BSEP/ABCB11	bile salt export pump
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
BW	body weight
CA	cholic acid
CCL2/MCP1	monocyte chemotactic protein-1
CD68	cluster of differentiation 68
CDCA	chenodeoxycholic acid
CETP	cholesterylester transfer protein
CHOL	cholesterol
CM	chylomicrons
CPT1a	carnitine palmitoyltransferase 1a
CTRL	control
CVD	cardiovascular disease
CYP27A1	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
CYP7A1	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1
CYP7B1	cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1
CYP8B1	cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1
DCA	deoxycholic acid
DGAT2	diacylglycerol O-acyltransferase 2
DIO	diet-induced obesity
ER	endoplasmic reticulum
EZE	ezetimibe
Fa	fractional absorption
FATP4	fatty acid transport protein 4
FGF15/19	fibroblast growth factor 15/19
FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4

FMO3	flavin containing monooxygenase 3
FNS	fecal neutral sterols
FPLC	fast protein liquid chromatography
FXR/NR1H4	farnesoid X receptor
FXR KO	FXR knockout
GATA4	GATA binding protein 4
GC	gas chromatography
GFP	green fluorescent protein
GCMS	gas chromatography mass spectrometry
Gly-MCA	glycine-muricholic acid
HDCA	hyodeoxycholic acid
HDL	high-density lipoprotein
HFD	high-fat diet
HMG	3-hydroxymethyl-3-glutaryl
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
HNF4α	hepatocyte nuclear factor 4, Alpha
HPLC	high-performance liquid chromatography
ICAM	intracellular adhesion molecule
IDL	intermediate-density lipoprotein
IFXR KO	intestine-specific FXR KO
IFXR TG	intestine-specific FXR transgenic
ILBβ	interleukin-1 β
IRMS	isotope-ratio mass spectrometry
KEGG	kyoto encyclopedia of genes and genomes
KO	knockout
LCA	lithocholic acid
LDL	low-density lipoprotein
LDLR	LDL receptor
LS	lovastatin
LXR	liver X receptor
lncLSTR	long non-coding liver-specific triglyceride regulator
LPL	lipoprotein lipase
LRH1/NR5A2	liver receptor homolog-1
LRP	LDL receptor-related protein
LW	liver weight
MAFG	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G
MCA	muricholic acid
MTTP	microsomal triglyceride transfer protein
MVK	mevalonate kinase
NEFA	non-esterified fatty acids
NPC1L1	niemann-pick disease, type C1 like-1
NTCP/SLC10A1	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter), member 1
OATP/SLCO1A2	solute carrier organic anion transporter family,

member	1A2
OSTα/SLC51A	solute carrier family 51, alpha subunit
OSTβ/SLC51B	solute carrier family 51, beta subunit
PBS	phosphate-buffered saline
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PL	phospholipids
PMVK	phosphomevalonate kinase
PSE	plant sterol esters
PSA	plant stanol esters
PX	PX20606
RCT	reverse cholesterol transport
RS	rosuvastatin
SCAP	SREBF chaperone; SRE-1, sterol regulatory element
SHP/NR0B2	small heterodimer partner
SHP2/PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
SIRT1	sirtuin 1
SR-BI/SCARB1	scavenger receptor class B, member 1
SRE-1	sterol regulatory element
SREBP1C/SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1
SREBP2/SREBF2	sterol regulatory element binding protein 2
SQLE	squalene epoxidase
SQS/FDFT1	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
TC	total cholesterol
TDP-43	TAR DNA binding protein
TG	Triglycerides
TGR5/GPBAR1	G protein-coupled bile salt receptor 1
TICE	transintestinal cholesterol excretion
TMA	trimethylamine
TMAO	trimethylamine N-oxide
TMCS	trimethylchlorosilane
TNFA	tumor necrosis factor α
UDCA	ursodeoxycholic acid
VLDL	very low-density lipoprotein
VLDLR	VLDL receptor
VSG	vertical sleeve gastrectomy
ω-MCA	ω -muricholic acid
WT	wild-type

I	References
II	Abbreviations
III	CONTRIBUTING AUTHORS & AFFILIATIONS
IV	Nederlandse Samenvatting
V	Dankwoord/Acknowledgements
VI	Biografie/Biography
VII	List of Publications

Contributing Authors & Affiliations

Bloks, VW ¹	Mele, L ¹
Boesjes, M ¹	Moschetta, A ⁹
Bos, T ¹	Oude Elferink, RPJ ⁸
Boverhof, R ¹	Plat, J ⁴
Brufau, G ¹	Schonewille, M ¹
de Boer, JF ¹	Shiri-Sverdlov, R ⁶
Dijkers, A ¹	Tietge ¹
Groen, AK ^{1,2,4}	van Deursen, JM ⁷
Havinga, R ¹	van Dijk, TH ¹
Jurdzinski, A ¹	Verkade, HJ ¹
Kremoser, C ¹⁰	Wolters, H ¹
Kuipers, F ¹	Wolters, JC ³
Kuivenhoven, JA ³	

1. Department of Pediatrics, Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.
2. Department of Laboratory Medicine, Center for Liver, Digestive and Metabolic Diseases, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.
3. Department of Pediatrics, Section Molecular Genetics, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.
4. Amsterdam Diabetes Center, Department of Vascular Medicine, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands.
5. Department of Human Biology, Maastricht University, Maastricht, The Netherlands
6. Department of Molecular Genetics, Maastricht University, Maastricht, The Netherlands
7. Department of Pediatric and Adolescent Medicine, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN, USA
8. Tytgat Institute for Liver and Intestinal Research and Department of Hepatology & Gastroenterology, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.
9. Department of Interdisciplinary Medicine, University of Bari and IRCCS Istituto Tumori "Giovanni Paolo II", Bari, Italy.
10. Phenex Pharmaceuticals AG, Heidelberg, Germany

Nederlandse Samenvatting

Inleiding

Cardiovasculaire aandoeningen, beter bekend als hart- en vaatziekten, zijn wereldwijd de grootste doodsoorzaak. Hyperlipidemie kan cardiovasculaire aandoeningen veroorzaken en het wordt gekarakteriseerd door verhoogde plasma concentraties van cholesterol en/of triglyceriden. Het verlagen van plasma cholesterol en/of triglyceriden concentraties is daarom ook een doeltreffende behandeling om het risico op cardiovasculaire aandoeningen te verminderen. Dit proefschrift beschrijft meerdere studies waarin cholesterol en/of triglyceriden in plasma verlaagd worden met behulp van farmaceutische componenten. Met behulp van deze farmaceutische componenten is er onderzoek gedaan naar de achterliggende mechanismen van cholesterol en triglyceriden stofwisseling.

Planten sterolen en planten stanolen verlagen naast plasma cholesterol ook plasma triglyceriden

Cholesterol is een vetachtige stof die een belangrijk onderdeel is voor de opbouw van celmembranen in mensen en dieren. Planten sterolen en planten stanolen lijken qua structuur op cholesterol en ze bevinden zich in planten, waar ze ook een rol spelen in de opbouw van celmembranen. Wanneer planten sterolen en stanolen toegevoegd worden aan het dieet met een inname van ongeveer 2 gram per dag zorgt dit voor een cholesterol verlaging in plasma van ongeveer 10%. Planten sterolen en stanolen worden daarom veelal toegevoegd aan boters en yoghurt, die geconsumeerd worden door mensen met een verhoogd plasma cholesterol. Behalve het verlagen van plasma cholesterol is er onlangs ook aangetoond dat planten sterolen en stanolen ook plasma triglyceriden verlagen in mensen met het metabool syndroom. Het metabool syndroom wordt gekenmerkt door obesitas, verstoorde vet- en glucosestofwisseling en verhoogde bloeddruk. Triglyceriden zijn opgebouwd uit drie vetzuren en glycerol en zijn nodig voor de energiestofwisseling. In **hoofdstuk 3** is onderzoek gedaan naar het achterliggende mechanisme van triglyceriden verlaging na plant sterolen en stanolen inname. Om dit te onderzoeken zijn muizen gedurende vier weken op een hoog vet dieet gezet om het metabole syndroom na te bootsen. Vervolgens zijn er planten sterolen of planten stanolen aan het dieet toegevoegd gedurende drie weken. In dit experiment hebben we kunnen onderzoeken hoe planten sterolen en stanolen plasma triglyceriden kunnen verlagen. Resultaten van deze studie hebben aangetoond dat de lever minder triglyceriden uitscheidt naar het plasma.

APPENDICES

I	References
II	Abbreviations
III	Contributing Authors & Affiliations
IV	NEDERLANDSE SAMENVATTING
V	Dankwoord/Acknowledgements
VI	Biografie/Biography
VII	List of Publications

De beroemde medicijnen statines verhogen de aanmaak van cholesterol

Eén van de meest gebruikte medicijnen ter wereld worden ook wel statines genoemd. Statines worden gebruikt om plasma cholesterol te verlagen. Cholesterol wordt aangemaakt door een proces wat bestaat uit meerdere stappen en statines werken in het laboratorium door de snelheidsbepalende stap van de aanmaak (synthese) van cholesterol te remmen. Vreemd genoeg is er nooit uitvoerig onderzoek gedaan of in het hele lichaam de cholesterol synthese ook daadwerkelijk wordt geremd onder invloed van statines. Vaak wordt een indirecte methode gebruikt om de cholesterol synthese te meten, hierbij worden zogenaamde voorlopers van de cholesterol synthese gemeten in het bloed. Door toepassing van deze methode werden door verschillende wetenschappelijke onderzoekers verlaagde voorlopers van cholesterol gemeten en daarbij geconcludeerd dat de cholesterol synthese verlaagd was. Ook kan de aanmaak van cholesterol gemeten worden door middel van een directe methode. Een directe methode om cholesterol synthese te meten is het toedienen van radioactief of stabiel gelabelde atomen om vervolgens te meten hoeveel van deze gelabelde atomen in het molecuul van cholesterol terug te vinden zijn. Door toepassing van deze directe methodes hebben verschillende onderzoekers geconcludeerd dat de aanmaak van cholesterol na statine behandeling in mensen niet verandert of zelfs omhoog gaat.

In **hoofdstuk 4** is er uitvoerig onderzoek gedaan naar de hoeveelheid cholesterol die wordt aangemaakt tijdens statine behandeling in muizen. In dit hoofdstuk hebben we twee verschillende directe methodes gebruikt om cholesterol synthese te meten, waarbij één inzicht geeft in de synthese van cholesterol in het totale lichaam en de andere inzicht geeft in de synthese in de lever en de dunne darm. Drie verschillende statines werden met elkaar vergeleken, namelijk atorvastatine, lovastatine en rosuvastatine. Resultaten van dit hoofdstuk tonen aan dat de cholesterol synthese in het totale lichaam sterk verhoogd is na behandeling met atorvastatine en lovastatine. Daarnaast werd ook de synthese in de lever en de dunne darm gemeten omdat het bekend is dat hier de meeste synthese van cholesterol plaats vindt. Statine behandeling resulteerde in verhoogde cholesterol synthese in zowel de lever als in de darm, maar in de lever was de cholesterol synthese het sterkst verhoogd in alle behandelde groepen. Aangezien voorlopers van de cholesterol synthese vaak gebruikt worden als maat voor cholesterol synthese is er vervolgens gekeken naar de concentraties van deze voorlopers. Concentraties van lathosterol, lanosterol en desmosterol (alle drie voorlopers van cholesterol) zijn gemeten in het plasma van statine behandelde muizen. Resultaten van deze analyses laten weinig grote verschillen zien en in vergelijking met de sterk verhoogde cholesterol aanmaak kunnen we dus concluderen dat het meten van voorlopers van cholesterol geen goede maat is voor de cholesterol synthese. Alhoewel de cholesterol synthese sterk verhoogd is na behandeling met statines, wordt er wel een verlaging van cholesterol in plasma waargenomen. Dit betekent dat het nieuw aangemaakte cholesterol dus niet

ophoopt in het plasma, maar waarschijnlijk wordt uitgescheiden met reverse cholesterol transport (RCT). RCT betekent de uitscheiding van cholesterol naar de ontlasting (feces). RCT kan via twee routes gebeuren, namelijk via de hepatobiliaire route of via de transintestinale cholesterol excretie (TICE) route. Als cholesterol via de hepatobiliaire route wordt uitgescheiden naar de feces gebeurt dit door uitscheiding van cholesterol in de lever naar het gal, vervolgens naar de darm en uiteindelijk komt het terecht in de feces. De TICE route beschrijft een nieuw ontdekte route waarin cholesterol wordt uitgescheiden vanuit het bloed direct naar de darm en uiteindelijk in de feces. Tijdens de statine behandeling in muizen werd er meer cholesterol uitgescheiden naar de feces en dat verliep voornamelijk via de hepatobiliaire route. Alleen in atorvastatine behandelde muizen werd ook een groot deel van het cholesterol uitgescheiden via de TICE route.

Via de transintestinale cholesterol excretie route kan enorm veel cholesterol worden uitgescheiden

Cholesterol staat sterk in verbinding met galzouten. In de lever wordt cholesterol omgezet in galzouten en vervolgens uitgescheiden naar de gal. De gal wordt opgeslagen in de galblaas en na een maaltijd leegt de galblaas zich en komt het gal in de dunne darm terecht. In de darmen fungeren de galzouten als een zeep en helpen hierbij om vetten op te lossen. Vetten kunnen hierdoor goed opgenomen worden in de darm en komen vervolgens in de bloedbaan terecht. Aan het eind van de dunne darm worden galzouten opnieuw opgenomen en terug getransporteerd naar de lever, waarna ze dezelfde route opnieuw kunnen afleggen. De circulatie van galzouten verloopt zeer efficiënt en slechts 5% van de circulerende galzouten gaan dagelijks verloren met de ontlasting. Dit betekent dus dat de aanmaak van galzouten ook streng gereguleerd is. In de darmen en in de lever kunnen galzouten binden aan de nucleaire receptor FXR (farnesoid X receptor). Een nucleaire receptor is een eiwit dat andere genen kan activeren of deactiveren. FXR kan een sterke invloed uitoefenen op de synthese van galzouten door betrokken genen te activeren of deactiveren. Wanneer FXR wordt geactiveerd door galzouten zorgt het er via verschillende stappen voor dat de aanmaak van galzouten in de lever geremd worden. Kort samengevat betekent dit dus als er veel galzouten zijn, er veel FXR wordt geactiveerd en er vervolgens minder galzouten worden aangemaakt.

In **hoofdstuk 5** hebben we in muizen FXR geactiveerd met behulp van een farmaceutisch component (genaamd PX20606) en vervolgens de stofwisseling van cholesterol bestudeerd. Een zeer interessante bevinding van dit experiment was dat door activatie van FXR er een enorme uitscheiding van cholesterol in feces gemeten werd. Deze enorme uitscheiding van cholesterol werd hoofdzakelijk gemedieerd door de TICE route en dit gaf ons de mogelijkheid om het mechanisme achter TICE te bestuderen. In de muizen die behandeld werden met de FXR activator werd een sterk geremde

opname van cholesterol in de darmen waargenomen. Om na te gaan of de geremde cholesterol opname in de darm de oorzaak of het gevolg was van de verhoogde cholesterol uitscheiding naar de feces, werden de muizen naast de FXR activator ook behandeld met ezetimibe. Ezetimibe is een farmaceutisch component dat specifiek de opname van cholesterol in de darmen remt. Behandeling met ezetimibe verhoogt ook de uitscheiding van cholesterol naar feces, alleen een stuk minder sterk dan de FXR activator. Wanneer de muizen met zowel de FXR activator als ezetimibe werden behandeld werd de uitscheiding van cholesterol naar feces zo hoog, dat dit opliep tot ongeveer 75% van het dagelijkse circulerende cholesterol in het lichaam van de muis. Dit was meer dan ezetimibe of FXR activator behandelde dieren samen. Dit betekende dat de verhoogde cholesterol uitscheiding naar de feces niet gemedieerd werd door een verlaagde opname van cholesterol in de darm. Vervolgens hebben we gekeken naar de ABCG5/G8 (ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), Member 5/8) transporter. ABCG5/G8 is een transporter die zich bevindt op de celmembraan van de darmcellen en functioneert als transporter van cholesterol vanuit de darmcellen naar het darmlumen. Verscheidene wetenschappers hebben al gesuggereerd dat de ABCG5/G8 transporter mogelijk betrokken is bij cholesterol excretie via TICE. Om dit te onderzoeken werd de FXR activator toegevoegd aan muizen waarbij het gen ABCG8 is geïnactiveerd is in het lichaam, de zogenaamde ABCG8 knock-out muis. De ABCG5/G8 transporter bestaat uit twee delen, namelijk ABCG5 en ABCG8, wanneer één van de twee delen wordt verwijderd, werkt de hele transporter niet meer. FXR activatie in ABCG8 knock-out muizen zorgde ervoor dat de cholesterol uitscheiding naar de feces zeer sterk verlaagd is en hierbij werd aangetoond dat ABCG5/G8 een grote rol speelt in de cholesterol uitscheiding via TICE. Uiteindelijk blijkt er ook een grote rol te zijn weggelegd voor de galzouten in de regulatie van TICE. In de regulatie van galzouten is FXR in de darm en in de lever belangrijk. In deze studie bleek dat de effecten door FXR in de darm werden gereguleerd. Wanneer FXR in de darm wordt geactiveerd wordt het eiwit FGF15/19 (fibroblast growth factor 15/19, voor muis en mens respectievelijk) aangemaakt wat vervolgens door de bloedbaan naar de lever wordt getransporteerd om daar een signaal af te geven wat vervolgens leidt tot verminderde aanmaak van galzouten in de lever. In muizen waarbij het FXR gen specifiek in de darm is verwijderd, wordt er geen FGF15 signaal meer afgegeven naar de lever. In de darm-specifieke FXR knock-out muizen werden geen effecten van FXR activatie meer waargenomen en wanneer in deze muizen het FGF19 eiwit werd toegediend middels een injectie, kwam de effecten van FXR activatie weer tevoorschijn. Het FGF15/19 signaal speelt dus een rol in de regulatie van TICE. Door activatie van FXR werd er een verschil geconstateerd in de samenstelling van de galzouten. Er bestaan verscheidene galzouten die verschillende eigenschappen hebben met betrekking tot hun oplosbaarheid in water. Na FXR activatie bestond de galzoutsamenstelling voornamelijk uit galzouten die goed oplosbaar waren in water (hydrofiel), in vergelijking met galzouten die moeilijk oplosbaar zijn in water (hydrofoob). Uiteindelijk hebben we getest hoe belangrijk de hydrofiel galzouten zijn in de regulatie

van cholesterol uitscheiding via TICE. Dit werd gedaan in ratten met een galomleiding. Bij een galomleiding wordt een canule aangebracht in de galgang van de rat en wordt de galgang afgebonden zodat er geen gal meer naar de dunne darm kan lopen. Vervolgens wordt deze canule getunneld naar de kop van het dier. Vervolgens wordt de canule teruggeleid naar de dunne darm van de rat. Op deze manier ontstaat er een verlengde galgang waarbij er de mogelijkheid bestaat om op de kop van de rat de galgang te onderbreken. Ratten met een galomleiding werden behandeld met de FXR activator en vervolgens werd het gal van de rat opgevangen en in plaats daarvan model gal geïnfuseerd. Het gal van de rat had een hydrofiel samenstelling en het model gal had een hydrofobe samenstelling. Wanneer er met hydrofoob model gal werd geïnfuseerd in ratten behandeld met de FXR activator daalt de cholesterol uitscheiding via TICE. Dit betekent dat de hydrofiel galzouten een zeer belangrijke rol spelen in de regulatie van TICE. Samengevat werd een deel van de regulatie van TICE opgehelderd in **hoofdstuk 5**. In de darm spelen hydrofiel galzouten, FXR en ABCG5/G8 hierbij een belangrijke rol.

Macrofaag-naar-feces RCT wordt gemedieerd door zowel de hepatobiliaire route als door TICE

Een te hoge concentratie plasma cholesterol kan leiden tot atherosclerose (aderverkalking). Atherosclerose ontstaat door ophoping van cholesterol in de wanden van slagaders. Het cholesterol zit opgeslagen in zogenaamde schuimcellen, dit zijn macrofagen (een variant van de witte bloedcellen) waarin veel cholesterol in op is geslagen. Hierdoor wordt de vaatwand steeds dikker en nauwer en wordt het moeilijker voor het bloed om er doorheen te stromen. Uiteindelijk kan atherosclerose leiden tot een hartinfarct of een beroerte. Er wordt veel onderzoek gedaan naar atherosclerose en een groot deel daarvan is gewijd aan het verwijderen van het overvloedige cholesterol uit de vaatwand en vervolgens de uitscheiding naar de feces, genaamd macrofaag-naar-feces reverse cholesterol transport. In de wetenschappelijke literatuur is een discussie ontstaan of macrofaag-naar-feces RCT gemedieerd wordt door de hepatobiliaire route of door TICE.

Hoofdstuk 6 beschrijft het experiment waarin we onderscheid hebben kunnen maken tussen de hepatobiliaire route en TICE met betrekking tot macrofaag-naar-feces RCT. In dit experiment hebben we twee gal omgeleide ratten aan elkaar gekoppeld. Het gal van rat 1 werd omgeleid naar de dunne darm van rat 2 en gal van rat 2 werd omgeleid naar de dunne darm van rat 1. In de eerste rat werden macrofagen met daarin radioactief gelabeld cholesterol ingespoten en vervolgens werd er gekeken of de macrofaag-naar-feces RCT via de hepatobiliaire route verliep of via TICE. Wanneer macrofaag-naar-feces RCT via de hepatobiliaire route verloopt, zal het radioactief gelabelde cholesterol van rat 1 via de lever in de gal terecht komen, omgeleid worden naar de dunne darm van rat 2 en vervolgens in het feces van rat 2 terecht

komen. Wanneer macrofaag-naar-feces RCT via de TICE route verloopt, zal het radioactief gelabelde cholesterol van rat 1 vanuit het bloed direct door de darmcellen in het darmlumen terecht komen en uiteindelijk in de feces van rat 1. Beide ratten werden behandeld met de cholesterol opname remmer ezetimibe en daardoor was de heropname van radioactief gelabeld cholesterol geblokkeerd. Resultaten van deze proef hebben aangetoond dat macrofaag-naar-feces RCT zowel via de hepatobiliaire route als de TICE route verloopt. Echter, de bijdrage van de hepatobiliaire route is het grootst.

Conclusies

Om het risico op cardiovasculaire aandoeningen te verlagen is het belangrijk om meer inzicht te verwerven in de factoren die een belangrijke rol spelen in het ontstaan hiervan. Hyperlipidemie is een grote risicofactor en resultaten beschreven in dit proefschrift dragen bij aan kennis over het verlagen van plasma cholesterol en/of triglyceriden. Transintestinale cholesterol excretie is een belangrijke route om cholesterol uit te scheiden naar de feces. Het achterhalen van het mechanisme van TICE en het stimuleren van deze route kunnen een grote bijdrage leveren voor het verlagen van het risico op cardiovasculaire aandoeningen in de toekomst.

Dankwoord/Acknowledgements

Het was augustus 2010 toen ik voor het eerst voet zette op het lab kindergeneeskunde in het UMCG, inmiddels alweer bijna 6 jaar geleden! Het begon allemaal met een leuk sollicitatiegesprek en kon ik al gauw aan mijn afstudeerstage beginnen, niet wetende dat ik hier zo lang zou blijven.

Na een succesvolle stage mocht ik nog jaar blijven als analist en ik ben tijdens dit jaar helemaal wegwijs geworden op het laboratorium. Vervolgens kreeg ik ook nog eens de buitengewone kans om voor 4 jaar promotieonderzoek te doen zonder eerst een masteropleiding te volgen. Er is één persoon geweest die mij al deze kansen heeft gegeven, en die wil ik daarom als eerst bedanken, prof. A.K. Groen. Beste Bert, bedankt dat je in mij geloofde en mij al deze kansen heb gegeven. We hebben ontzettend veel meetings achter de rug waarin we het ene interessante resultaat bespraken en de volgende experimenten alweer aan het verzinnen waren. Je stimuleerde mij altijd om dieper over alles na te denken en daar heb ik ontzettend veel van geleerd.

“Don’t pick a job. pick a boss. Your first boss is the biggest factor in your career success. A boss who doesn’t trust you won’t give you opportunities to grow.”

- William Raduchel

Wetenschappelijk onderzoek verricht je niet in je ééntje en ik heb het geluk gehad om de afgelopen jaren samen te werken met 2 verschillende postdocs. Allereerst, Gemma. Thank you Gemma for all your guidance during my internship, technician year and during the first years as a PhD-student. But most of all, thank you for all the fun we had together! It was great working with you. I almost succeeded to work at what I call ‘Gemma-speed’, which mean doing everything three times faster than possible. I can’t believe that it has been 3 years since you left Groningen. Dan hebben we natuurlijk Jan Freark. Wat hebben wij belachelijk veel experimenten gedaan zeg. Het ene experiment na het ander, het kon niet op. Het spijt me voor je dat het je

“Alone we can do so little; together we can do so much.”

- Helen Keller

niet gelukt is om mij op stang te jagen met je gemene grapjes of met je boze buien op het CDP. Desondanks hebben we altijd leuk samengewerkt en dat heeft ons hele mooie resultaten opgeleverd.

Naast het samenwerken met postdocs heb ik ook mogen profiteren van de hulp van de analisten in het lab. Henk, ik zou graag willen bedanken voor al het werk dat je hebt verricht op het lab en het meedenken aan alle projecten die we hadden lopen. Zonder jou was het zeker niet mogelijk geweest om al die experimenten erdoorheen te rammen. Rick, bedankt voor het uitvoeren van al die ingewikkelde operaties het was altijd erg gezellig om met jou

samen te werken. Vervolgens zou ik graag Angelika willen bedanken voor alle genotyperingen, histologie en hulp op het CDP. Het was gezellig om jouw als 'buurvrouw' te hebben tijdens mijn jaar als analist. Niels, bedankt voor alle hulp in de virusweek. Renze, bedankt voor alle hulp met betrekking tot het opwerken en uitvoeren van GC bepalingen. Theo Boer, hele erg bedankt voor het opwerken van al die bloedspotjes en voor alle analyses op de GCMS en IRMS. Martijn en Klaas, bedankt voor alle metingen op de GCMS en LCMS. Albert, bedankt voor je hulp met de HMG meting. Tineke, bedankt voor de BHB meting. Ingrid, bedankt voor de vetzuurmetingen. Daarnaast wil ik de analisten, Aycha, Bojana, Trijnie, Dicky (succes met je promotieonderzoek!) en Danny bedanken voor hun directe als wel indirecte hulp op het lab. Vincent en Theo, bedankt voor al jullie hulp bij het analyseren van microarrays, cholesterol kinetiek en statistiek! Bedankt dat jullie altijd klaar stonden om vragen te beantwoorden. Moreover, I would like to thank Laura and Karen for helping me with my projects during their internships.

During my time as a PhD-student, I spend a lot of time abroad in the laboratory of UMR 1011 in Lille, France. Thank your Prof. B. Staels for having me and thank you for the nice discussions we have had. Furthermore I would like to thank Olivier and Sophie for the supervision of my projects, dinners at your homes and helping me to find my way around Lille. Thank you Camille for all the experiments we have performed together! It was not possible to do it all by myself. And thank you for the great party you invited me to, "*Ça se boit*

"Science knows no country, because knowledge belongs to humanity, and is the torch which illuminates the world."

- Louis Pasteur

comme du petit-lait!". Lets hope that your article will be published soon! Thank you Véronique for helping me around the lab and with the isolations of lipoproteins. Sami, my time in Lille wouldn't have been so much fun if it wasn't for you. Thank you for all the time we spend together downtown in Lille (and Paris and Spetses of course). "*It is not that difficult to tell alligators and crocodiles apart. One will*

see you later, the other will see you in a while", right Sami?. The same goes for Valeria, Federica, Michal, Sarah and everyone else who joined during the times we met up.

Graag zou ik alle coauteurs van mijn manuscripten willen bedanken voor alle tijd en moeite die jullie erin hebben gestoken. In het bijzonder wil ik Prof. J. Plat bedanken voor de samenwerking met betrekking tot de planten sterolen en planten stanolen studies. Bij deze wil ik de leden van de beoordelingscommissie, prof. B. Staels, prof. E.S. Stroes en prof K.N. Faber, bedanken voor het beoordelen van mijn proefschrift. Daarnaast wil ik graag de professoren en PI's van het lab bedanken voor discussies, wijze raad en gezellige kletspraat bedanken: Henkjan (zeer enthousiaste "TICE-er"), Uwe (anytime is cookietime right?), Torsten (Mr. M&M's), Hans (jij kan echt mega

snel gavages geven), Maaïke O. (laat die CCD je niet klein krijgen!), Bart (hopelijk kun je nog wat met het iCommd1 project), Jan Albert, Barbara, Dirk-Jan, Klary, Janine, Frans, Folkert.

Hilde en Gea, wat moet een lab nou zonder zulke fantastische secretaresses als jullie. Het was altijd fijn om eventjes bij jullie kantoor langs te lopen en op de hoogte gebracht te worden van de laatste nieuwtjes. En Hilde, voor jou is er altijd nog de mogelijkheid om de acteerwereld in te gaan: borstjes vooruit, lipjes getuit, dag lieve schat!

Wanneer je wat langer op het lab rondloopt dan de gemiddelde promovendus, betekent dat ook dat je te maken hebt gehad met veel verschillende collega's! Wat ik erg bijzonder vind is dat na 5 jaar de samenstelling van het lab compleet is veranderd. Ik heb veel collega's zien komen en gaan en ik heb daarbij dus ook veel leuke mensen leren kennen. Arne (cameraman, regisseur, director

"Working hard and working smart sometimes can be two different things."

- Byron Dorgan

en danser van de JF promotievideo), Gijs (of moet ik zeggen Jan Freark?), Maurien, Karen, Wijtske, Margot, Mariëtte, Marjan, Willemien, Nienke, Anke (fijn dat ik jouw oude bureau én je studio kon overnemen), Andrea, Jolita, Elodie, Tim (bedankt voor het spontaan keutels stampen op zaterdagmiddag), Agnes, Aldo, Jurre, Marijke, Dolf, Otto,

Juul, Weilin, Mathijs, Vera (zóóó jammer dat je niet mee ging quadrijden op Spetses!!), Nicoline (a.k.a. muizenruikster Janita), Irene, Ana (I hope you still enjoy my old bike), Lori, Maaïke B (Ik ben heel erg benieuwd de PXMP4 muizen), Marleen D, Anne-Claire, Agnieszka, Sarah, Violeta, Jurgen, Yared, Sanam, Onne, Yu, Rima, Mirjam and last but not least Lidiya! Thank you Lidiya for a the fun times we had, you were more a friend than a colleague to me. We spend some great times during dinners, movies, cakes, drinks and party's!

Daarnaast wil ik ook graag alle MDL-ers bedanken voor het creëren van zo'n gezellige werksfeer op het lab. Tjasso, Manon, Janette, Anouk, Haukeline, Atta, Ali, Danial, Shiva, Alfredo, Mark, Floris, Esther, Marjolein, Jacky, Mariska, Golnar, Klaas Nico en Han.

Mijn experimenten waren nooit zo goed verlopen dankzij de mensen van het CDP. Van dierversorger tot frontoffice medewerker en van schoonmaker tot microchirurg, iedereen bedankt! Graag zou ik in het bijzonder de dierversorgers willen bedanken die altijd goed voor mijn dieren zorgden op zowel de eerste verdieping als in de DMII: Sander (altijd gezellig en je hielp me altijd met de vreemdste verzoeken), Maurice (dankzij jou kan ik ook gavages geven), Natascha en Ar.

Mijn tijd bij kindergeneeskunde was niet zo aangenaam geweest als het niet was voor alle roomies van de chickies room. Het was altijd gezellig op ons kantoor en ik heb erg genoten van alle diners en borrels die we na werktijd hebben gehad! Als je dagelijks met elkaar op het kantoor opgesloten zit leer je elkaar goed kennen door alle kletspraat maar ook serieuze gesprekken. Bedankt voor een hele leuke tijd: Brenda (wij konden altijd heel goed switchen van werken naar praten en terug naar werken), Marije (altijd gezellige kletspraat met jou en hopelijk wordt ons artikel snel gepubliceerd), Gemma, Carolien (naast kamergenoot was je ook nog eens mijn bovenbuurvrouw), Marcela, Joanne (bij jou kon ik in mijn schrijfperiode lekker klagen over dat ik zoveel aan het vreten was), Jelena, Karin, Ying, Sandra, Kees, Vinay, Ivo en Archie!

Lieve paranimfen, bedankt voor alle hulp bij het organiseren van mijn promotiedag! Marcela: I really like your quote *"It is better to be rich and healthy, than to be poor and sick"*. We were almost like 'friends at first sight', but I had to

"Friendship... is not something you learn in school. But if you haven't learned the meaning of friendship, you really haven't learned anything."

- Muhammad Ali

go to Lille after we just met. I admire how you are coping with travelling up and down from Dusseldorf with Helena and sometimes Leia. I am very honored that I can be your bridesmaid at your wedding and I will try to keep my Slovak vocabulary to myself that day. Aycha: Vanaf mijn eerste dag op het lab was jij er al en je hebt mij goed geholpen om wegwijs te worden in het lab. Jij bent echt één van de meest

sociale personen die ik ken en het was altijd super gezellig om jou als collega te hebben. Ondanks jouw drukke sociale agenda was er toch vaak wel tijd voor een 'roomies' diner.

Hoe kan een mens gelukkig leven als die de waarde van ware vriendschap niet heeft ontdekt? Bij mijn vrienden kan ik me altijd ontspannen, uitleven, mijn gekke kant laten zien, mijn verhalen kwijt, kortom mijzelf zijn. Als we elkaar een tijdje niet hebben gezien kunnen we uren met elkaar bijkletsen en als we elkaar teveel zien komt er alleen nog maar onzin uit en wordt alles steeds grappiger. Bedankt dat jullie zulke goede vrienden zijn. Sanne, jou ken ik echt al mega lang! Ik kan me niet meer herinneren wanneer ik jou precies voor het eerst ontmoette omdat mijn geheugen toen nog niet helemaal ontwikkeld was. Wat hebben we al veel samen meegemaakt, de basisschool, middelbare school, vele vakanties, pieken, dalen, alles! En Anouk, als Sanne's zusjes ken ik jou natuurlijk al sinds jij nog in je luiertje poepte. Het is altijd één groot feest met jou. Sharon, jij bent iemand die zich heel goed kan uitdrukken. Blij, boos, verdrietig, gelukkig, enthousiast, het is altijd duidelijk bij jou. En er daarom is altijd wel wat te beleven als jij er bent. Alita, altijd rustig, kalm en sarcastisch. Fantastisch! Sari, het is altijd gezellig als jij erbij bent. Jason, ook al zie ik je soms een tijdje niet, het is altijd gelijk weer gezellig

"A friend may well be reckoned the masterpiece of nature."

- Ralph Waldo Emerson

als we weer eens bijpraten. Marijke, jij bent echt een superwoman. Ik heb echt bewondering voor jouw doorzettingsvermogen en moed! Nantie, wij kunnen samen goed vreten en drinken! Hopelijk gaan we dat nog heel veel doen, want dat is altijd gezellig! Sanna en Evelien,

we kennen elkaar sinds de HLO en na ons afstuderen zijn we nog altijd in contact gebleven. Ik heb altijd heel erg genoten van de gezellige etentjes die we samen hebben gehad en ik hoop dat er nog meer volgen, desondanks ik nu ver weg ben gaan wonen.

Lieve familie, bedankt voor jullie onvoorwaardelijke steun in goede en slechte tijden. Lieve oma, ooms, tantes, neven en nichten, bedankt voor jullie interesse en alle gezellige tijden. In het bijzonder wil ik graag Roelien, Marjolein en Esther bedanken, jullie zijn meer dan alleen mijn nichtjes, voor mij zijn jullie vriendinnen en mijn 'bijna-zusjes'. Gerard, grote broer, je mocht mij vroeger altijd graag treiteren maar ik ben blij dat je toch bent opgegroeid en dat we nu soepeltjes door één deur kunnen. Jeroen, jij was vroeger altijd Gerard's treiter assistentje, maar gelukkig is die periode ook allang weer voorbij. Ik ben blij dat ik zulke leuke broers heb en we zo goed met elkaar kunnen opschieten! Lieke en Rana, eindelijk heb ik eens zusjes! Ik ben erg blij dat jullie erbij zijn gekomen. Lieve papa en mama, ik ben blij dat jullie mijn ouders zijn! Bedankt voor alle wijze raad en steun in de keuzes die ik maak en hebt gemaakt om het beste uit mijzelf te halen.

Lieve Jairo, *mi ta stimabu*! Ik ben ontzettend dankbaar dat jij in mijn leven bent gekomen en ik kan mij inmiddels al niet meer anders voorstellen. Samen met jou en Juvi is alles veel leuker en ik ben benieuwd wat de toekomst ons zal brengen.

"Home is where the heart is."

- Pliny the Elder

Liefs,

Marleen

A

Biografie

Marleen Schonewille werd op 21 november 1987 geboren te Hogeveen. Men opgegroeid in het nabijgelegen dorpje Noordscheschut met haar ouders en haar twee broers. Aan het Roelof van Echten College te Hogeveen behaalde zij in 2005 haar HAVO diploma met de profielen Natuur & Techniek en Natuur & Gezondheid. In 2008 heeft zij versneld haar diploma middenkaderfunctionaris medische laboratorium techniek gehaald aan het Drenthe College te Emmen. Vervolgens kon zij beginnen aan een versneld traject van de Bachelor biologie en medische laboratorium research aan de Hanzehogeschool in Groningen. Haar afstudeerstage heeft plaats gevonden in het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG) op de onderzoeksafdeling Kindergeneeskunde onder begeleiding van Dr. G. Brufau en Prof. A.K. Groen. In 2011 heeft ze haar Bachelor diploma in ontvangst genomen en is vervolgens direct gestart als research analist op de afdeling kindergeneeskunde in het UMCG, gedetacheerd vanuit de afdeling Humane Biologie van de Universiteit Maastricht. Na een jaar als research analist gewerkt te hebben kon zij in 2012 beginnen aan haar promotieonderzoek in het UMCG onder begeleiding van prof. A.K. Groen op de afdeling Kindergeneeskunde met als doel het mechanisme achter transintestinale cholesterol excretie te achterhalen. Tijdens haar promotieonderzoek is Marleen regelmatig afgereisd naar de stad Lille in Frankrijk om daar onderzoek te doen binnen de onderzoeksgroep van prof. B. Staels op het lab INSERM UMR 1011. De resultaten van haar promotieonderzoek staan beschreven in dit proefschrift.

Biography

Marleen Schonewille was born on the 21st of November 1987 in Hogeveen, the Netherlands. She was raised in the nearby village Noordscheschut with her parents and two brothers. In 2005 she graduated from high school at Roelof van Echten College in Hogeveen. Thereafter, Marleen graduated as medical laboratory technician at Drenthe College in Emmen in 2008. Afterwards, she followed a fast track of the Bachelor Biology and Medical Laboratory Research at the HanzeUniversity in Groningen. During the bachelor program, she performed her final internship at the research department of pediatrics at the University Medical Center Groningen (UMCG) under the supervision of Dr. G. Brufau and Prof. A.K. Groen. In 2011, she received her bachelor degree and subsequently started as a research technician at the department of pediatrics at the UMCG, posted from the department of human biology of the Maastricht University. After working as a research technician for a year, she started as a PhD student at the department of pediatrics at the UMCG under the supervision of prof. A.K. Groen. The goal of her research project was to elucidated the mechanism behind transintestinal cholesterol excretion. During her time as a PhD-student, Marleen travelled regularly to the city of Lille in France to conduct research in the laboratory INSERM UMR 1011 of prof. B. Staels. Results of her work are described in this dissertation.

A

APPENDICES

I	References
II	Abbreviations
III	Contributing Authors & Affiliations
IV	Nederlandse Samenvatting
V	Dankwoord/Acknowledgements
VI	BIOGRAFIE/BIOGRAPHY
VII	List of Publications

List of Publications

Schonewille M, Brufau G, Shiri-Sverdlov R, Groen AK, Plat J. Serum TG-lowering properties of plant sterols and stanols are associated with decreased hepatic VLDL secretion. *Journal of Lipid Research*. 2014 Dec;55(12):2554-61

De Smet E, Mensink RP, Konings M, Brufau G, Groen AK, Havinga R, **Schonewille M**, Kerksiek A, Lütjohann D, Plat J. Acute intake of plant stanol esters induces changes in lipid and lipoprotein metabolism-related gene expression in the liver and intestines of mice. *Lipids*. 2015 Jun;50(6):529-41

Briand O, Touche V, Colin S, Brufau G, Davalos A, **Schonewille M**, Bovenga F, Carrière V, de Boer JF, Dugardin C, Clavey V, Tailleux A, Moschetta A, Lasunción MA, Groen AK, Staels B, Lestavel S. Liver X receptor regulates triglyceride absorption via intestinal SR-BI down-regulation. *Gastroenterology*. 2015 Nov 18. pii: S0016-5085(15)01632-7

Schonewille M, de Boer JF, Groen AK. Bile salts in control of lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*. 2016 Jun;27(3):295-301.

Schonewille M, de Boer JF, Mele, L, Wolters H, Bloks VW, Wolters JC, Kuivenhoven JA, Tietge UJF, Brufau G, Groen AK. Statins increase hepatic cholesterol synthesis and stimulate fecal cholesterol elimination in mice. *Journal of Lipid Research*. 2016 Jun 16

Jakulj L, van Dijk TH, de Boer JF, Kootte RS, **Schonewille M**, Boer T, Vincent W. Bloks, Boverhof R, Nieuwdorp M, Beuers UHW, Stroes ESG, Groen AK. Distribution of cholesterol fluxes in humans: effect of ezetimibe. *Under revision, Cell Metabolism*

Schonewille M, de Boer JF, Boesjes M, Wolters H, Bos T, van Dijk TH, Jurdzinski A, Bloks VW, Boverhof R, van Deursen J, Oude Elferink RPJ, Moschetta A, Kremoser C, Verkade HJ, Kuipers F, Groen AK. Transintestinal cholesterol excretion can drive massive cholesterol elimination in mice. *Submitted*

De Boer JF, **Schonewille M**, Dijkers A, Havinga R, Tietge UJF, Groen AK. Transintestinal and biliary cholesterol secretion both contribute to macrophage reverse cholesterol transport in rats. *Submitted*

Dugardin C, Briand O, Touche V, **Schonewille M**, Groen AK, Staels B, Lestavel S. TICE-like trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in the human Caco-2/TC7 cell line. *Submitted*

I	References
II	Abbreviations
III	Contributing Authors & Affiliations
IV	Nederlandse Samenvatting
V	Dankwoord/Acknowledgements
VI	Biografie/Biography
VII	LIST OF PUBLICATIONS

